

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1900

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

*Présentée et soutenue le Jeudi 5 Avril 1900
à 1 heure de l'après-midi*

PAR

M. EDOUARD DUJARDIN - BEAUMETZ

Né à Paris le 12 août 1868

Ancien externe des hôpitaux

Médaille de bronze de l'Assistance publique

Préparateur à l'Institut Pasteur

LE MICROBE DE LA PÉRIPNEUMONIE ET SA CULTURE

Étude Bactériologique d'un Microorganisme à la limite de la Visibilité

Président : M. CHANTÉMESSE, Professeur

Juges : MM. { HUTINEL, Professeur
LETULLE { Agrégés
WURTZ }

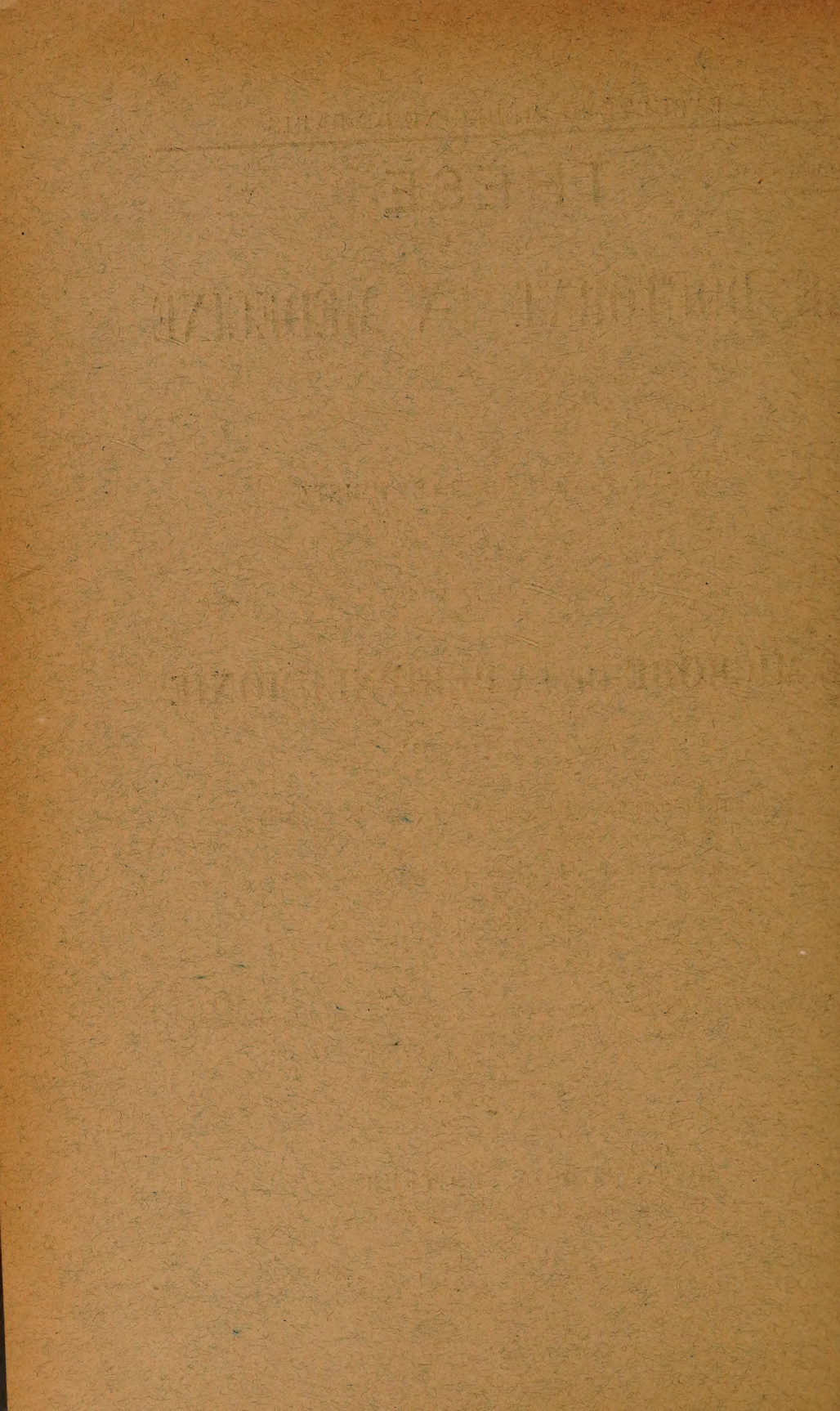
*Le candidat répondra aux questions qui lui seront faites
sur les différentes parties de l'enseignement médical*

PARIS

OCTAVE DOIN, ÉDITEUR

8, PLACE DE L'ODÉON

1900



Année 1900

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

*Présentée et soutenue le Jeudi 5 Avril 1900
à 1 heure de l'après-midi*

PAR

M. EDOUARD DUJARDIN - BEAUMETZ

Né à Paris le 12 août 1868

Ancien externe des hôpitaux

Médaille de bronze de l'Assistance publique

Préparateur à l'Institut Pasteur

LE MICROBE DE LA PÉRIPNEUMONIE

ET

SA CULTURE

Étude Bactériologique d'un Microorganisme à la limite de la Visibilité



Président : M. CHANTEMESSE, Professeur

Juges : MM. { HUTINEL, Professeur
{ LETULLE { Agrégés
{ WURTZ {

*Le candidat répondra aux questions qui lui seront faites
sur les différentes parties de l'enseignement médical*

PARIS

OCTAVE DOIN, ÉDITEUR

8, PLACE DE L'ODÉON

1900

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

A MES MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX

M. LE DOCTEUR QUÉNU

Professeur agrégé à la Faculté de Médecine

Chirurgien de l'Hôpital Cochin

M. LE DOCTEUR A. CHAUFFARD

Professeur agrégé à la Faculté de Médecine

Médecin de l'Hôpital Cochin

A LA MÉMOIRE DE MES REGRETTÉS MAÎTRES

MM. LES DOCTEURS HANOT ET CONSTANTIN PAUL

A MES MAÎTRES DE L'INSTITUT PASTEUR

M. E. DUCLAUX

Membre de l'Institut

Directeur de l'Institut Pasteur

M. LE DOCTEUR E. ROUX

Membre de l'Institut

Sous - Directeur de l'Institut Pasteur

M. E. METCHNIKOFF

Chef de Service à l'Institut Pasteur

M. ED. NOCARD

Professeur à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR CHANTEMESSE

Médecin des Hôpitaux

INTRODUCTION

Après les grandes découvertes de Pasteur et de Koch, personne ne doutait qu'on ne parvînt bientôt à connaître le microbe spécifique de chaque maladie contagieuse. Le rapide perfectionnement des méthodes bactériologiques permettait cette espérance, et cependant, malgré tous les efforts accumulés depuis quinze ans, on n'est pas arrivé à mettre en évidence les microbes de certaines maladies infectieuses de l'homme telles que la syphilis, la rougeole, la scarlatine, la variole, etc. Non seulement nous ne connaissons pas les microbes qui causent ces affections, mais il nous est impossible jusqu'à présent d'expérimenter sur la plupart d'entre elles puisque nous ne pouvons pas les communiquer aux animaux.

Il y a aussi des maladies contagieuses du bétail dont le microbe nous échappe tout aussi complètement que celui des fièvres éruptives de l'homme ; la clavelée des moutons, la fièvre aphteuse et la péripneumonie des bêtes bovines sont dans ce cas. Mais au moins pouvons-nous les inoculer à volonté ; c'est donc par elles qu'il

faut commencer l'étude des maladies à microbes inconnus. Nous en tirerons peut-être des indications applicables aux maladies exclusivement humaines.

Bien souvent l'idée est venue que dans ces affections contagieuses où nous ne voyons aucun microbe, il en existe cependant de si petits que nos instruments les plus puissants ne les grossissent pas assez pour que nous puissions les apercevoir. De sorte qu'à côté des cocci, bacilles, spirilles, amibes déjà décrits, il y aurait d'autres microbes si ténus qu'on n'en saurait dire la forme.

Cette hypothèse a trouvé dernièrement une justification dans une expérience de M. Löffler. Ce savant a montré que le virus de la fièvre aphteuse traverse les bougies filtrantes Berkefeld qui arrêtent toutes les bactéries connues ; il est donc plus petit qu'elles.

Dans le même temps, MM. Roux et Nocard sont parvenus à cultiver le microbe de la péripneumonie dans un milieu liquide. On peut en faire desensemencements successifs et obtenir des cultures en série assez riches en microbes de la péripneumonie pour que chaque gouttelette inoculée sous la peau d'une vache suffise à la tuer. Cette culture si active reste transparente et c'est à peine si on peut la distinguer du liquide non ensemencé.

Examinée au microscope, elle ne montre que des granulations si ténues qu'on n'en peut préciser la forme. Le microbe de la péripneumonie est donc à la limite de la visibilité ; il nous fournit une transition entre les microbes ordinaires visibles au microscope et ceux qu'on ne voit plus à cause de leur petitesse.

Avec MM. Borrel et Salimbeni, j'ai été associé aux recherches de MM. Roux et Nocard, qui ensuite m'ont chargé d'étudier les méthodes de culture et les propriétés de ce microbe. C'est le sujet de ce travail.

Nous tenons à exprimer à notre cher maître, le D^r Roux, notre profonde gratitude pour la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée et les précieux avis qu'il n'a cessé de nous prodiguer.

Nous ne saurions trop remercier le professeur Nocard de la complaisance avec laquelle il nous a aidé de ses savants conseils.

LE

MICROBE DE LA PÉRIPNEUMONIE

ET SA CULTURE

CHAPITRE PREMIER

La péripneumonie.

On désigne sous le nom de péripneumonie ou pleuro-pneumonie du gros bétail une maladie contagieuse épizootique sévissant exclusivement sur les bovidés, localisée au poumon et à la plèvre et caractérisée par une exsudation fibrino-séreuse dans le tissu cellulaire interlobulaire et sous-pleural.

Historique. — Après la peste bovine, la péripneumonie est une des épizooties les plus meurtrières qui fit, avant l'application sévère des mesures sanitaires, des ravages considérables dans les troupeaux.

Les premières observations furent faites dès 1693 par Valentini, qui étudia une affection contagieuse de poitrine régnant sur les bovidés; plus tard, Camerarius constata

une épidémie d'hydropisie de poitrine qui ne serait autre que la péripneumonie.

La grande épidémie qui sévit en Suisse en 1743 permit à Haller d'étudier avec soin cette affection contagieuse. De Suisse, la péripneumonie gagna successivement l'Alsace, la Franche-Comté et la Champagne.

Les étables des environs de Paris furent décimées par le fléau en 1790 ; puis, vers 1822, la maladie fit son apparition dans le département du Nord et de là s'étendit aux Flandres et à la Hollande. Ces pays payèrent un lourd tribut à la péripneumonie et furent considérés pendant longtemps comme la patrie du mal ; nous devons ajouter qu'ils furent aussi le berceau de la prophylaxie de cette maladie. C'est, en effet, en Belgique, qu'un médecin de Hasselt, le docteur Willems, préconisa, dès 1852, une méthode de vaccination, qui, bien que l'objet de violentes polémiques au début, rendit des services importants aux éleveurs de cette région et donne aujourd'hui des résultats si satisfaisants que la pratique des inoculations willemsiennes est devenue obligatoire dans les foyers épidémiques.

En 1844, après la suppression du bill prohibitif d'importation, l'Angleterre fut contaminée par du bétail hollandais ; de là, la péripneumonie envahit la Suède et le Danemark. Les Etats-Unis sont atteints (1859) ; la maladie est introduite dans la colonie du Cap par un taureau hollandais (1854). L'Australie fut contaminée à son tour par du bétail importé.

On peut donc dire qu'aujourd'hui la péripneumonie contagieuse des bovidés est répandue sur tous les points du globe et qu'elle cause des pertes considérables dans les pays où se trouvent de grands centres d'élevage, comme la République Argentine, le Sud Africain et l'Australie.

Nous citerons quelques chiffres pour montrer l'énorme mortalité causée par cette épizootie. Pendant une période de 19 ans (1827 à 1846) le département du Nord perdit plus de 200.000 têtes de bétail (Loiset). En Hollande, de 1830 à 1840, 60.000 bovidés succombent à la péripneumonie. La Prusse Rhénane, de 1835 à 1845, accuse une mortalité de 100.000 bêtes (Sauberg). Cette maladie aurait fait périr dans les îles Britanniques, pendant la seule année de 1860, plus de 150.000 bêtes bovines (Gamgee).

Symptômes. — Nous prendrons comme type clinique de la maladie la forme aiguë de la péripneumonie, c'est-à-dire celle que l'on rencontre le plus habituellement.

Le début de l'affection est insidieux ; l'animal est triste, abattu ; le poil est piqué et terne, les cornes et les oreilles chaudes ; l'appétit est inconstant ; la rumination se fait mal. La respiration s'accélère (20 à 30 mouvements respiratoires) ; le pouls est rapide (60 à 70 pulsations). La température atteint et dépasse même 40°.

La sécrétion lactée disparaît chez la vache laitière.

A cette période de prodromes succèdent des symptômes plus caractéristiques. Au moindre effort que fait l'animal, il fait entendre une toux sèche et quinteuse que l'on a comparée au *hein!* des boulangers. La région costale est douloureuse à la pression ; cette sensibilité est telle qu'en pinçant l'animal au niveau du garrot, il fléchit la colonne vertébrale pour se soustraire à ce contact douloureux. C'est même là un signe des plus caractéristiques que l'on ne devra jamais négliger de rechercher dans la péripneumonie.

Durant cette période, les signes fournis par la percussion sont de peu de valeur ; l'auscultation ne permet de constater qu'un peu de rudesse respiratoire

Dans la période d'état de la maladie, les symptômes du début s'accroissent.

L'animal se tient, les pattes écartées, la tête basse, le col allongé, dans un état d'abattement et d'hébétéude extrême. La respiration s'accélère (40 à 50 mouvements respiratoires). Le pouls devient plus rapide (80 à 100 pulsations). La toux est grasse, profonde, douloureuse, accompagnée quelquefois d'un jetage muqueux.

L'hyperesthésie de la région costale est extrême; la fièvre est violente (41°).

La percussion de la poitrine décèle dans les régions inférieures du thorax une matité limitée supérieurement par une ligne horizontale indiquant un épanchement pleural.

Le murmure vésiculaire a disparu et est remplacé par un souffle pleurétique.

Dans la région supérieure du thorax, on perçoit, à la percussion, des zones de matité et de submatité comprenant soit un lobe pulmonaire, soit des foyers disséminés d'hépatisation.

En auscultant à ce niveau, on entend des bouffées de râles crépitants ou du souffle tubaire suivant l'évolution de la lésion : autour de ces foyers pneumoniques, il est facile de percevoir des gros râles sibilants.

Bref, tous les signes physiques fournis par la percussion et l'auscultation dénotent l'existence d'une bronchopneumonie accompagnée d'un épanchement pleural.

À la période ultime de la maladie, on observe parfois des œdèmes au fanon et dans la région abdominale. L'animal ne tarde pas à succomber par asphyxie.

La durée de la péripneumonie aiguë ne dépasse guère trois semaines.

La maladie, dans les formes moins graves, peut évoluer vers une pseudo-résolution, car les lésions ne disparaissent

sent jamais complètement et peuvent devenir le point de départ d'une nouvelle poussée inflammatoire qui emporte l'animal.

D'autres fois, la péripneumonie passe à l'état chronique; des séquestres se forment au niveau des foyers d'hépatisation; l'arbre aérien est atteint de bronchectasie; l'animal se cachectise et meurt par épuisement après deux ou trois mois.

L'arthrite et la synovite sont une complication que l'on observe surtout chez les veaux à la mamelle; les articulations et les gaines synoviales des membres sont le siège d'un œdème douloureux rendant impossible la station debout.

Anatomie pathologique. — A l'ouverture du thorax d'un animal ayant succombé à la péripneumonie ou abattu au cours de la période aiguë de la maladie, on constate l'existence d'une pleurésie fibreuse pseudo-membraneuse et exsudative; la cavité pleurale est remplie d'un liquide séreux, de couleur ambrée, contenant en suspension des flocons de fibrine. La plèvre costale présente peu d'altération, alors qu'au contraire le feuillet viscéral est épaissi considérablement et recouvert de fausses membranes.

C'est dans le poumon que se trouvent les lésions essentielles de la péripneumonie, lésions qui consistent dans l'infiltration séreuse du tissu cellulaire et des lymphatiques périlobulaires.

Quand on pratique une coupe dans le lobe hépatisé, un liquide séreux teinté de sang vient sourdre en abondance de la paroi sectionnée qui présente un aspect marbré caractéristique. Le tissu conjonctif qui cimente les lobules pulmonaires est d'une épaisseur considérable mesurant de 2 millimètres à 2 centimètres; il est gorgé de sérosité qui

s'écoule de la surface de section et forme un réseau à mailles inégales circonscrivant des polygones de teintes différentes allant du rose vif au noir. Ces espaces polygonaux sont constitués par les lobules pulmonaires plus ou moins altérés par le processus inflammatoire et la compression exercée par l'œdème périlobulaire qui les entoure.

Le poumon ainsi infiltré est plus dense que l'eau ; son tissu a perdu son élasticité primitive ; il ne crépite plus sous le doigt et est devenu d'une extrême friabilité. Il n'est pas rare de voir des poumons hépatisés peser 25 et même 50 kilogrammes.

Les bronches et les vaisseaux sont entourés d'une gangue celluleuse œdématiée. Dans le médiastin, on observe parfois des tumeurs conjonctives infiltrées de sérosité comprimant la trachée et l'œsophage. Les ganglions bronchiques sont hypertrophiés et les bronches dilatées contiennent une exsudation muco-fibrineuse.

L'examen histologique permet de constater les altérations plus intimes du parenchyme pulmonaire. Les alvéoles sont remplies d'un exsudat fibrineux contenant des hématies, des leucocytes et des cellules détachées de la paroi endothéliale. Les mailles du tissu connectif sont distendues et les lymphatiques sont remplis de sérosité fibrineuse.

Le processus inflammatoire atteint primitivement le tissu conjonctif et ce n'est que secondairement que les lobules pulmonaires sont atteints de pneumonie.

Etiologie et contagion. — La plupart des auteurs anciens étaient partisans de la spontanéité de la péripneumonie ; la quantité considérable de sérosité imprégnant le tissu pulmonaire les avait frappés et ils attribuaient cette infiltration soit à l'influence météorologique (froid humide, brouillard), soit à une alimentation trop aqueuse (four-

rages submergés, plantes marécageuses) ou trop abondante (théorie de la pléthore séreuse) ou trop spéciale (résidus de distillerie et de sucrerie). Cette dernière hypothèse semblait plausible; car, dans les régions du Nord et dans les Flandres, la péripneumonie fait de nombreux ravages dans les étables où les animaux consomment les drèches. Mais il faut voir là, non l'influence de l'alimentation, mais celle des conditions défectueuses de stabulation. De plus, les animaux ne font que passer dans les étables pour y être engraisés; il se fait donc un renouvellement continu de bétail très favorable à la contagion.

La nature contagieuse de la péripneumonie n'est mise en doute aujourd'hui par personne.

Ce fut le Dr Willems, de Hasselt(1), qui le premier démontra expérimentalement la contagion et l'inoculation de la péripneumonie.

Willems trempe l'extrémité d'une lancette dans le liquide séreux qui s'écoule du poumon d'un animal récemment abattu et fait une inoculation par simple piqûre sous-cutanée. Après un temps qui varie de 6 à 20 jours, la maladie se déclare : « L'animal souffre, dit-il, « il est moins vif; il mange moins; quand on touche « l'endroit où l'inoculation a été faite, cette partie est ordinairement sensible; puis elle se tuméfie, elle s'enflamme, « elle se durcit fortement; cette dureté inflammatoire des « tissus morbides s'étend quelquefois au loin et quand « l'inoculation a été faite dans un endroit mal choisi, la « mort peut s'ensuivre. Dans la partie tuméfiée se fait « un dépôt de matière exsudée, excessivement abondant,

(1) L. WILLEMS. *Mémoire sur la péripneumonie épizootique du bétail*, 1852.

« absolument comme dans les poumons des animaux
« malades. »

On détermine donc par l'inoculation une maladie spéciale caractérisée par un œdème envahissant le tissu cellulaire sous-cutané.

L'infiltration pénètre jusque dans les interstices musculaires; mais jusqu'à présent il n'a pas été possible de reproduire les lésions pulmonaires de la péripneumonie spontanée. Et cependant cette maladie nouvelle est bien due au virus péripneumonique, puisque des animaux ayant résisté à cette inoculation souvent mortelle sont devenus réfractaires à la péripneumonie, soit par une nouvelle réinoculation, soit par cohabitation avec du bétail contaminé.

Les inoculations pratiquées au niveau du garrot et du fanon provoquent des symptômes graves généralement mortels; elles ne peuvent donc être employées pour immuniser contre la maladie. Willems parvint à vacciner avec cette sérosité si virulente en l'inoculant dans une région éloignée du tronc de l'animal; en piquant au moyen d'une lancette la queue près du toupillon, il déterminait un léger engorgement limité à l'extrémité caudale. Cette maladie bénigne préservait les animaux d'une nouvelle atteinte de péripneumonie.

Willems reconnut aussi, au cours de ses expériences, que l'homme et tous les animaux autres que les bovidés étaient réfractaires à cette maladie.

Des commissions furent nommées pour vérifier cette nouvelle méthode de vaccination et reconnurent que l'inoculation de la lymphe pulmonaire ne transmet pas aux animaux sains une maladie semblable à la péripneumonie, mais qu'elle investit l'organisme d'une immunité qui les met à l'abri de la contagion.

Mesures sanitaires. — Les mesures applicables à la péripneumonie sont basées sur cette vaccination willem-sienne des animaux sains et sur l'abatage des bêtes malades.

La plupart des pays dans lesquels sévit la péripneumonie ont adopté ce double système de défense qui leur a permis d'enrayer la marche de cette épizootie.

En France, les prescriptions sanitaires sont les suivantes :

« Dans le cas de péripneumonie contagieuse, le Préfet
« devra ordonner l'abatage, dans le délai de deux jours,
« des animaux reconnus atteints de cette maladie par le
« vétérinaire délégué et l'inoculation des animaux d'espèce
« bovine dans les localités reconnues infectées de cette
« maladie. » (Art. 9. Loi de 1881.)

CHAPITRE II

Le microbe de la péripneumonie.

Déjà en 1852, Willems et Van Kempen avaient décrit des corpuscules animés de mouvements browniens dans la sérosité péripneumonique; plus tard, en 1881, Bruylants et Verriest(1) constatent la présence de microbes dans la lymphe pulmonaire : ce sont des coccus se cultivant sur les milieux nutritifs habituels et qui, inoculés à des bœufs, auraient déterminé des phlegmons.

En 1882, Pasteur fut prié par la Société d'agriculture de Melun de faire des expériences sur la péripneumonie.

Il s'attacha tout d'abord à recueillir le virus péripneumonique dans des conditions de pureté absolue, afin de donner toute sûreté aux inoculations expérimentales.

Il reconnut, en effet, que :

« 1° Le virus péripneumonique prélevé convenablement sur les poumons malades de diverses origines est
« un produit *pur*, non associé à des germes de microbes
« étrangers;

« 2° Que le virus ne se cultive pas dans nos bouillons
« ordinaires, de poule, de veau, de levure de bière (2). »

Ces faits précis, prouvant que les milieux nutritifs ordinaires restaient stériles après ensemencement de sérosité

(1) BRUYLANTS et VERRIEST. Recherches sur le microbe de la péripneumonie bovine. *Archives vétérinaires*, 1881.

(2) PASTEUR. Note sur la péripneumonie des bêtes à cornes. *Revue vétérinaire*, 1883.

recueillie purement, devaient servir de base fondamentale dans l'étude bactériologique de la péripneumonie.

Malgré cette affirmation de Pasteur, de nombreux expérimentateurs décrivent des microbes cultivant bien sur les milieux usuels et dont aucun ne reproduisait l'infiltration péripneumonique et ne vaccinait contre une inoculation de sérosité virulente.

Lustig (1), en 1885, isole du poumon différentes espèces microbiennes dont quelques-unes étaient pathogènes et provoquaient des abcès chez les animaux inoculés.

Poels et Nolen (2), en 1884 et 1887, observèrent dans la lymphe pulmonaire un microorganisme ayant une grande analogie avec le bacille de Friedländer : ce microbe était pathogène pour tous les animaux de laboratoire.

Cornil et Babès (3) constatent dans les coupes du poumon des granulations ressemblant à des microcoques et quelques bâtonnets courts ; mais ils ne poussèrent pas plus loin l'étude bactériologique de cette maladie.

En 1889, M. Arloing (4) ensemence, sur gélatine, la sérosité qui s'écoule spontanément de la paroi pulmonaire et isole plusieurs espèces microbiennes dont un bacille liquéfiant rapidement la gélatine (*Pneumobacillus liquefaciens boris*). Les cultures de ce microbe injectées dans le poumon causent des bronchopneumonies mortelles chez le veau ; les cultures filtrées sont toxiques pour le bœuf et le cobaye et contiennent une matière phlogogène provoquant de l'œdème au point d'inoculation.

Des expériences de vaccination faites à Melun avec ce

(1) LUSTIG, *Centralblatt für die medic. Wissenschaft.*, 1885.

(2) POELS et NOLEN. Le ~~contage~~ de la péripneumonie. *Recueil vétérinaire*, 1887.

(3) CORNIL et BABÈS. Les bactéries : chap. *Péripneumonie*, 1890.

(4) ARLOING, *C. R. Acad. des Sciences*, 1888 et 1893.

pneumobacille ne donnèrent que des résultats négatifs.

Nous avons dit que la péripneumonie est exclusivement une maladie des bovidés. En effet la sérosité péripneumonique la plus active, injectée en quantité considérable, au cobaye, au lapin, etc., ne les rend pas malades. Il n'en était pas de même des cultures obtenues par les auteurs dont nous venons de parler; inoculées aux animaux de laboratoire à doses suffisantes, elles déterminaient des accidents locaux et causaient parfois la mort.

Pour expliquer cette différence d'action entre le virus naturel de la sérosité et le virus cultivé, ils invoquaient que le microbe est plus abondant et plus virulent dans les cultures; mais, chose surprenante, ces cultures actives sur les petits animaux d'expériences ne produisaient chez les vaches qu'une lésion locale passagère bien différente de l'œdème envahissant qui suit l'introduction sous la peau d'une trace de sérosité naturelle. Une autre circonstance aurait dû avertir que les cultures n'étaient point celles du vrai microbe péripneumonique, c'est l'absence d'incubation; chez les vaches, la tuméfaction locale se montrait quelques heures après l'inoculation du liquide de culture, tandis qu'il ne survient jamais qu'après une incubation de 6 à 20 jours à la suite de l'inoculation de la sérosité péripneumonique.

Continuant les recherches sur la péripneumonie commencées par Pasteur, MM. Nocard et Roux poursuivirent les essais de culture, mais leurs tentatives restèrent infructueuses.

Lorsqu'en 1896, dans leur mémoire sur la toxine et l'antitoxine cholérique, MM. Metchnikoff, Roux et Salimbeni (1) eurent donné une nouvelle méthode de culture

(1) METCHNIKOFF, ROUX et SALIMBENI, Toxine et antitoxine cholérique. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1896.

in vivo, MM. Nocard et Roux avec leurs collaborateurs MM. Borrel, Salimbeni et Dujardin-Beaumetz appliquèrent ce procédé à la péricapneumonie (1).

Cette méthode consiste dans l'emploi de petites ampoules de collodion contenant du bouillon ensemencé avec le microbe dont on poursuit l'étude, et introduites dans la cavité péritonéale d'un animal.

Ces sacs peuvent être stérilisables par la chaleur sans perdre de leur souplesse, et l'osmose se fait parfaitement à travers leur membrane. Les humeurs de l'animal traversent la paroi de collodion qui forme une barrière infranchissable pour les phagocytes; les microbes ensemencés y pullulent en grande abondance et y sécrètent, à l'abri des leucocytes, les produits toxiques qui, par dialyse, se répandent dans l'organisme animal.

Ce procédé très ingénieux permet de cultiver et de conserver les microbes les plus fragiles qui peuvent ainsi se multiplier dans les humeurs d'un animal réfractaire.

Les petits sacs sont introduits dans le péritoine après laparotomie et les animaux supportent très bien la présence de ces corps étrangers dans leur cavité péritonéale.

Après un certain laps de temps, l'animal est sacrifié et, à l'autopsie, on trouve l'ampoule de collodion logée dans quelque coin de la cavité péritonéale, entourée d'une gangue fibrineuse dont on l'énuclée facilement.

On n'a qu'à puiser au moyen d'une pipette dans ce sac pour étudier la culture qui s'y est développée.

Pour remplacer le collodion, M. Metchnikoff recommande l'emploi de la très fine membrane tubulaire qui tapisse la cavité du roseau (*Phragmites communis*). Cette membrane celluleuse, mince et fort résistante, est très per-

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898.

méable aux liquides et permet ainsi une dialyse rapide.

C'est grâce à ce procédé de culture *in vivo* que MM. No-card et Roux ont réussi à cultiver le microbe de la péripneumonie, et nous rappellerons succinctement leurs expériences à ce sujet.

Des sacs de collodion ou de roseau furent remplis de bouillon ensemencé avec une trace de sérosité péripneumonique recueillie purement et insérés dans la cavité péritonéale d'un lapin.

Deux semaines après, l'animal est sacrifié. Le liquide retiré du sac est albumineux, opalescent et contient en suspension une quantité de très petits points réfringents mobiles et d'une ténuité telle qu'il est impossible de déterminer leur forme même aux plus forts grossissements.

Un sac témoin non ensemencé et placé comme le précédent dans le péritoine renferme un liquide albumineux absolument limpide.

Le liquide dans lequel a poussé le microbe de la péripneumonie est opalescent, c'est le seul signe qui indique sa culture. Et encore est-il si peu marqué qu'il eût certainement échappé si l'on n'avait eu soin de mettre dans le péritoine des animaux des sacs témoins non ensemencés. C'est par comparaison que le bouillon ensemencé paraissait un peu opalin.

Une génisse inoculée avec quelques gouttes de ce liquide louche est prise d'un engorgement rapidement envahissant; l'infiltration œdémateuse énorme est identique à celle que l'on observe à la suite de l'inoculation de quelques gouttes de sérosité pulmonaire.

Dans cette première expérience, on aurait pu croire qu'il ne s'agissait là que d'une simple dilution de virus sans multiplication de l'agent spécifique. Mais une série d'ensemencements successifs de sac à sac et en même

temps d'inoculations à chaque passage levèrent tous les doutes à cet égard.

Dans les sacs, on retrouvait le même liquide légèrement trouble renfermant ces petits points mobiles et réfringents. La vache inoculée avec le deuxième passage présenta un engorgement considérable au point d'inoculation : l'œdème, traité par des injections iodées, disparut et l'animal résista à cette atteinte.

La vache inoculée avec le contenu d'un troisième sac présenta une large tuméfaction et résista.

Si les œdèmes constatés étaient véritablement dus à une culture de péripneumonie, ces animaux devaient avoir acquis l'immunité. C'est ce que l'expérience démontra. En effet, ils résistèrent à l'inoculation en région défendue de sérosité péripneumonique, alors qu'une vache témoin succombait avec un œdème considérable.

Cette opalescence particulière du bouillon retiré des sacs de collodion était donc l'indice d'une culture de l'agent spécifique de la péripneumonie, puisque quelques gouttes de ce liquide produisaient un œdème caractéristique quelquefois mortel et donnait l'immunité aux animaux ayant résisté.

A cette époque, MM. Nocard et Roux nous associèrent à leurs travaux sur la péripneumonie et sa culture en milieux artificiels.

Une seule fois, un tube de bouillon peptonisé ensemencé avec quelques gouttes de sérosité présenta une culture analogue à celle des sacs. Après 72 heures d'étuve, le bouillon devint opalescent et contenait des petits points extrêmement fins et mobiles. Il fut impossible d'obtenir un deuxième repiquage. Mais cette première culture permettait de penser qu'il était possible de cultiver ce microbe en dehors de l'organisme.

Après de longues recherches, on parvint à trouver un milieu nutritif favorable à la pullulation du microbe de la péripneumonie. Dans le chapitre suivant, nous étudierons en détail les conditions et les caractères de la culture de cet infiniment petit, presque invisible pour les yeux de l'homme.

CHAPITRE III

La culture in vitro.

Récolte de la sérosité péripneumonique. — Dans la pratique courante, la sérosité utilisée pour les inoculations willemssiennes est recueillie dans des conditions de pureté relative. Dans le poumon hépatisé d'un animal mort récemment, on pratique avec un scalpel une cavité infundibuliforme au fond de laquelle se rassemble le liquide séreux qui s'écoule de la paroi sectionnée. On puise avec des pipettes, dans ces *fontaines*, la sérosité virulente; celle-ci doit être utilisée peu de temps après le prélèvement; car ce liquide recueilli sans précaution s'altère et peut provoquer chez les animaux inoculés des accidents gangréneux (1).

Pour obvier à ces graves inconvénients, Pasteur (2) avait réussi à obtenir une grande quantité de sérosité absolument pure et par conséquent inaltérable. En effet, en inoculant un veau au fanon ou derrière l'épaule, il se forme au point d'inoculation une infiltration considérable envahissant tout le tissu cellulaire sous-cutané et à laquelle l'animal succombe rapidement. Cet œdème four-

(1) Pour conserver la sérosité recueillie de cette façon, M. Nocard recommande d'ajouter à un volume de celle-ci un demi-volume d'eau phéniquée à 5/1000 et un demi-volume de glycérine. Dans ces conditions, le liquide ne s'altère pas et conserve sa virulence pendant deux ou trois mois au moins. (*Soc. centrale de Méd. vétérinaire*, 1892).

(2) PASTEUR. Note sur la péripneumonie des bêtes à cornes. *Revue vétérinaire*, 1883.

nit une quantité considérable de virus pur qu'il est facile de recueillir en ampoules. Dans ces conditions, la sérosité peut se conserver pendant trois mois et plus, sans atténuation de sa virulence.

Ce procédé a rendu de signalés services dans la lutte contre la péripneumonie.

Mais pour faire desensemencements de péripneumonie, point n'est besoin d'une telle quantité de sérosité et quelques gouttes prélevées purement suffiront.

Pour faire ces prises, il faut opérer sur un poumon hépatisé d'un animal abattu au cours de la période aiguë de la maladie.

La plèvre viscérale recouvrant le poumon semble, en différents endroits, décollée du tissu pulmonaire sous-jacent. Ces espaces ne sont autres que les lacs lymphatiques gorgés de sérosité : après avoir brûlé la paroi pleurale, on introduit à ce niveau l'extrémité effilée d'une pipette et l'on peut ainsi recueillir 1 à 2 centimètres cubes d'un liquide ambré et transparent parfaitement pur.

Si ces espaces lymphatiques sont difficiles à mettre en évidence dans une plèvre trop épaissie, il est facile de puiser dans le tissu cellulaire sous-pleural, ou bien encore, après section du lobe hépatisé, dans les travées de tissu conjonctif interlobulaire. Mais, dans ce cas, la pipette doit être enfoncée peu profondément, car on risque de pénétrer dans un lobule voisin et de recueillir ainsi une sérosité teintée de sang, le plus souvent impure.

Dans toutes les premières recherches sur la culture du microbe de la péripneumonie, c'est de cette façon qu'étaient faites les prises de sérosité.

Mais aujourd'hui toute cette technique pour les prélèvements est inutile, et la sérosité, recueillie dans les fontaines d'après la vieille méthode vétérinaire, est utili-

sable pour le bactériologiste. Nous verrons en effet que le microbe de la péripneumonie traverse les bougies filtrantes et que, par ce procédé, il est facile de l'isoler des autres microbes.

Des milieux de culture. — Milieu liquide. — Le microbe de la péripneumonie ne se multiplie que dans un bouillon peptonisé spécial additionné de sérum.

Nous n'utilisons jamais pour le cultiver les peptones du commerce qui ne donnent que rarement des résultats positifs dans les cultures de péripneumonie.

Nous nous servons exclusivement de l'eau peptonisée employée par le docteur L. Martin pour la production de la toxine diphtérique et nous empruntons à son mémoire la technique pour la préparation de cette peptone provenant de l'auto-digestion d'estomac de porc.

Bouillon d'estomac de porc ou bouillon de panse. — « Pour
« l'obtenir, nous prenons ces estomacs de porc et nous
« broyons ou hachons ensemble les tuniques muqueuse
« et musculaire.

« Plaçons ce hachis dans l'eau acidulée à 50° dans les
« proportions suivantes :

Hachis d'estomac de porc.....	200 grammes
Acide chlorhydrique pur.....	10 —
Eau à 50°.....	4000 —

« L'eau doit être maintenue à 50°, car à cette température la pepsine de la muqueuse stomacale digère plus
« activement les tissus et les transforme en peptone.

« Après 12 heures, l'opération est généralement terminée. On peut, sans inconvénient, attendre 24 heures.
« Dans ce milieu très acide, il ne se développe pas de
« microbes. Lorsque la digestion est achevée, on chauffe

« le bouillon d'estomac de porc à 100°. On détruit ainsi la « pepsine en excès (1). »

Pour la conservation de cette eau peptonisée acide, il suffit de la chauffer tous les deux jours à 100°, et après trois ou quatre chauffages le liquide se clarifie et peut être utilisé.

Pour employer cette peptone, on alcalinise d'abord le bouillon de panse. On chauffe cette eau peptonisée à 80°, puis on y ajoute de la solution de soude à 10 % jusqu'à réaction alcaline, puis on filtre sur papier.

Macération de viande. — On fait macérer à froid dans un litre d'eau pendant douze heures 500 grammes de viande de veau hachée. Puis on exprime dans un linge, et on ajoute à ce liquide 5 grammes de sel marin par litre.

M. L. Martin emploie pour la diphtérie de la viande fermentée à 35°. Pour la culture de la péripneumonie, le bouillon fait avec de la viande fraîche donne de meilleurs résultats.

Préparation du bouillon peptonisé. — « A cette macération de viande je mélange un litre de la solution de « peptone déjà alcalinisée, filtrée et préparée comme il a « été dit plus haut avec les estomacs de porc.

« Quand on a mélangé, par parties égales, la macération de viande et le bouillon de panse de porc, on « chauffe à 70°, jusqu'à coagulation des matières albumi- « noïdes, on filtre sur papier et on alcalinise (2). »

Le bouillon doit être franchement alcalin, c'est-à-dire qu'il doit être alcalin au tournesol et acide à la phénophtaléine.

Bouillon sérum. — A ce bouillon nous ajoutons du

(1) L. MARTIN, Production de la toxine diphtérique. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898.

(2) L. MARTIN, *loc. cit.*

sérum normal de bœuf dans la proportion de 6 à 8 %. Ce bouillon albumineux est stérilisé par filtration sur bougie Chamberland, réparti en matras ou en tubes, et éprouvé pendant quarante-huit heures à l'étuve.

Le bouillon ainsi obtenu est un liquide ambré parfaitement limpide, si l'on a eu soin d'employer pour sa fabrication du sérum normal. En effet, si l'on utilise, au lieu de sérum normal, du sérum stérilisé par chauffage discontinu à 58°, le bouillon devient trouble dès que l'on dépasse la proportion de 5 %. Même filtré, le bouillon reste opalin; aussi est-il absolument impossible d'observer la culture du microbe de la péripneumonie, qui justement ne s'accuse que par la légère opalescence du milieu nutritif où il s'est multiplié.

Pour avoir toujours en réserve une quantité suffisante de sérum normal, il n'est nullement nécessaire de recourir à la ponction intraveineuse faite aseptiquement; il suffit de le stériliser par filtration. Le sérum filtre assez facilement à travers la porcelaine, soit sous pression de plusieurs atmosphères, soit par simple aspiration. Une bougie Chamberland F peut filtrer environ un litre de sérum en deux heures; la bougie Berkefeld, composée de terre d'infusoires et plus poreuse que la porcelaine, filtre encore plus aisément les liquides albumineux. Le sérum, ainsi stérilisé, est recueilli en ballons scellés que l'on peut utiliser au fur et à mesure des besoins.

Milieu solide. — Le microbe de la péripneumonie ne cultivant qu'à une température supérieure à 30°, la gélatine ne peut être employée comme substratum solide. Nous ne pouvions donc nous servir que d'un milieu gélosé.

Au début de nos recherches sur la culture *in vitro* de la péripneumonie, nous avons employé un milieu solide

gélосé préparé à froid. A une partie de gélose concentrée (gélose, 50 gr. et eau, 1.000 gr.) nous ajoutions, avant qu'elle fût prise, deux parties de bouillon sérum. Sur ce milieu solide, nous avons obtenu les premières colonies de péricpneumonie; mais les résultats étaient inconstants et dépendaient du mélange plus ou moins homogène du bouillon sérum et de la gélose.

De plus, ce milieu était trouble, et il était difficile d'apercevoir, à travers cette gelée non translucide les très fines colonies qu'y donnait la sérosité ensemencée.

Mais, au cours de notre étude à ce sujet, nous avons reconnu que le bouillon peptonisé, préparé suivant la méthode du docteur L. Martin, pouvait être chauffé à 115°, sans perdre de sa valeur nutritive pour le microbe de la péricpneumonie.

Voici la préparation du milieu gélосé qui nous a donné les meilleurs résultats pour la culture de ce microbe :

Le bouillon peptonisé est additionné de 15 grammes de gélose par litre, chauffé à l'autoclave à 115°, filtré, réparti en tubes et incliné; c'est le procédé employé dans les laboratoires pour faire la gélose nutritive.

Lorsque la gélose est bien adhérente au verre, on retire, au moyen d'une pipette, l'eau de condensation rassemblée dans le fond du tube, et on la remplace par 1/2 cc. environ de sérum normal filtré.

Les tubes sont ensuite inclinés pendant vingt-quatre heures, afin que le sérum s'étale à la surface du milieu solide et imbibе la gélose.

Eprouvés à l'étuve, ils sont prêts à être ensemencés. Cette gélose nutritive est aussi transparente que de la gélatine, et permet d'observer à la loupe et aux faibles grossissements du microscope les colonies qui s'y sont développées.

Caractères de la culture en bouillon sérum. — Pour obtenir une culture primitive de péricnemonie, il n'est pas besoin de se servir d'un passage en sac de collodion; il suffit d'ensemencer, avec une trace de sérosité recueillie purement un tube de bouillon sérum.

Après un séjour de deux à trois jours dans l'étuve à $+ 37^{\circ}$, on remarque que le bouillon, limpide au début, est devenu légèrement opalin. Cette opalescence peut même passer inaperçue, si l'on n'a pas pris le soin de placer à l'étuve un tube de bouillon-sérum témoin.

Pour déterminer le début et les progrès de l'opalescence, qui est la seule preuve de la présence du microbe dans le milieu liquide, il est nécessaire d'user d'un procédé permettant de déceler de bonne heure les modifications de la transparence du bouillon. Au moyen d'un écran percé d'un trou, placé entre une source lumineuse et le tube de culture, nous faisons traverser le milieu liquide par un faisceau lumineux qui rend perceptible les moindres différences dans la limpidité du bouillon. En agitant le tube, on met en évidence des ondes soyeuses que l'on ne pouvait voir à la lumière diffuse.

C'est, en somme, le même phénomène que l'on observe quand un rayon solaire pénètre dans une chambre obscure et rend visibles les poussières en suspension dans l'air qui nous semblait, à la lumière diffuse, d'une transparence parfaite. Dès que le bouillon, qui, avant l'ensemencement, était optiquement pur, se transforme par suite de la multiplication du microbe en une très fine émulsion bactérienne, il devient opalescent, par suite de la réflexion de la lumière sur cette myriade de microbes en suspension dans le liquide.

Examinons maintenant au microscope ce bouillon opalin en goutte suspendue ou mieux encore sous une lamelle.

Les plus forts grossissements (1.500 et 2.000 diamètres) ne nous permettent d'y déceler que de très fines granulations mobiles, agitant par contact les particules albumineuses en suspension dans le bouillon.

Dans une préparation faite avec une goutte du tube témoin, les mêmes particules sont animées d'un mouvement brownien, mais ce mouvement est moins étendu que celui observé dans l'examen de la culture.

Caractères de la culture en milieu solide. — Si l'on étale à la surface d'un tube de gélose sérum tel que nous l'avons préparé plus haut une goutte de sérosité péripneumonique ou de bouillon opalescent, nous obtiendrons, après trois ou quatre jours d'étuve, des colonies microbiennes tellement fines qu'on ne peut les distinguer qu'à la loupe et à jour frisant. Mais, pour déterminer leur forme et leurs caractères, mieux vaut les examiner sur la platine du microscope à un faible grossissement.

De cette façon, on aperçoit à travers la gélose de très petites colonies, réfringentes, transparentes, comparables à des gouttelettes de rosée, rarement confluentes et dont le diamètre mesure environ 0^{mm}2.

A partir du cinquième jour de la culture, les colonies prennent une forme caractéristique. Au centre apparaît une zone bien délimitée, ronde, mesurant 0^{mm}2 de diamètre, granuleuse et de couleur brunâtre, se présentant sous la forme d'un mamelon opaque au milieu de la colonie. Cette partie centrale conserve ses dimensions primitives alors que la colonie s'étend sur la gélose et peut atteindre jusqu'à 1 millimètre de diamètre.

Ces caractères se conservent même dans les cultures plus âgées : les colonies sont seulement blanchâtres à l'œil

nu et deviennent granuleuses si on les observe à un faible grossissement.

Dans les premiers jours de la culture, elles sont rarement confluentes ; puis peu à peu la zone transparente pérिमamelonnaire s'agrandit et rejoint les colonies voisines ; aussi n'est-il pas rare de voir de grandes colonies à bords festonnés au centre desquelles se trouvent plusieurs mamelons brunâtres qui ne sont autres que les origines des colonies primitives qui se sont confondues.

Quand on passe à la surface de cette culture sur gélose un fil de platine ou une tige de verre pour faire, un ensemencement ou une préparation, les colonies restent intactes. Elles sont en effet incrustées dans la gélose ; le mamelon central ne fait pas saillie à la surface, mais pénètre au contraire dans le substratum nutritif et l'on ne peut mieux comparer ces colonies de péripneumonie qu'aux clous appelés *punaïses* dont se servent les dessinateurs.

Le fil de platine n'a touché que la mince pellicule microbienne étalée sur la surface de gélose sans désorganiser le contour de la colonie, et a pris suffisamment de germes pour faire un nouvel ensemencement sur un tube de gélose sérum où apparaîtront après trois jours les mêmes petites colonies mamelonnées.

Essais de coloration. — Quand, après avoir desséché sur une lame une goutte du bouillon où s'est faite une culture de péripneumonie, on colore cette préparation par une couleur basique d'aniline, on ne voit qu'un fin précipité et quelques particules albumineuses colorées que d'ailleurs on trouve dans une préparation identique faite avec une goutte de bouillon témoin.

Ce précipité est dû, en grande partie, au sérum contenu dans le milieu nutritif.

On évitera cet inconvénient, en raclant la surface de la gélose et en faisant une émulsion microbienne dans l'eau distillée.

Dans les préparations faites de cette manière et colorées, on ne voit qu'une très fine poussière dont, avec les plus forts grossissements, on ne peut distinguer les éléments.

En colorant avec le Ziehl à chaud, ou même en mordant les préparations, soit au tannate d'osmium selon le procédé de Van Ermengen, soit au tannate de fer d'après la méthode de Löffler, il est impossible de voir un élément microbien ayant une forme bien distincte.

Le microbe de la péripneumonie est-il donc réfractaire aux matières colorantes usitées en bactériologie? Non. Il prend au contraire la couleur avec une extrême facilité.

Au lieu d'essayer de colorer des émulsions microbiennes, nous avons coloré en masse toute une colonie microbienne prise sur la gélose.

Avec un rasoir, on prélève à la surface de la gélose une mince tranche contenant les colonies qui y sont incrustées et on porte cette coupe de gélose sur une lame, puis on laisse sécher complètement.

Il est impossible d'utiliser sur ces coupes de gélose les couleurs d'aniline qui colorent en masse tout le substratum solide : aussi ne doit-on employer que les matières colorantes ayant une affinité particulière pour les noyaux comme l'hématoxyline ou l'hématéine.

La tranche de gélose est laissée en contact pendant environ une heure avec la solution colorante d'une de ces substances, puis on décolore la gélose qui a pris une belle teinte violette en la plongeant pendant un quart d'heure dans une solution d'acide acétique au tiers, on lave à l'eau pour retirer l'excès d'acide, et l'on monte dans la glycérine.

Les colonies microbiennes, après ces manipulations, restent intactes et apparaissent au microscope colorées en violet sur un fond décoloré et transparent.

Elles ont conservé leur forme primitive : le mamelon, fortement coloré, est entouré d'une zone violette plus claire.

On peut même faire de la sorte dans la gélose des sections perpendiculaires à la surface de culture que l'on colore par le procédé ci-dessus ; ce qui permet de constater que les mamelons, au lieu de faire saillie à la surface du milieu solide, sont au contraire enfoncés profondément dans la gélose comme de petits clous.

C'est à cause de cette particularité que ces colonies incrustées peuvent être manipulées sans se désagréger.

Mais quand nous avons voulu étudier l'action des couleurs d'aniline qui ont l'inconvénient de colorer le milieu solide, nous avons employé le procédé suivant en décalquant les colonies microbiennes sur une lame de verre.

On prélève, comme précédemment, une tranche de gélose que l'on applique sur la lame porte-objet, la surface contenant les colonies contre le verre, puis on laisse sécher la préparation.

Il suffit alors de gratter avec un scalpel la gélose qui s'enlève par petites écailles et la partie supérieure de la colonie reste adhérente au verre sans trace de gélose.

Il n'y a qu'à faire agir sur ces cultures décalquées les couleurs basiques d'aniline.

Ces colonies microbiennes se colorent rapidement par les couleurs basiques d'aniline usitées en bactériologie (Violet de Gentiane, Fuchsine, Bleu de Méthylène, Thionine). Elles se décolorent par la méthode de Gram.

Lorsqu'on examine ces préparations à de forts gros-

sissements, on ne peut distinguer qu'une fine poussière colorée composée d'éléments irréguliers formés par l'agglomération de microbes. Mais il est impossible de déterminer la forme d'un élément pris isolément.

Le microbe de la péripneumonie se colore donc facilement par les colorants nucléaires et son invisibilité tient seulement à son extrême ténuité.

Conditions de la culture. — Le microbe de la péripneumonie est un microbe surtout aérobie. Il cultive d'autant mieux que la surface du milieu nutritif en contact avec l'air est plus grande. Dans le vide ou en présence de gaz inertes, la culture se fait avec difficulté et ce n'est qu'après un séjour de huit à dix jours à l'étuve que le liquide devient légèrement opalescent.

La température la plus favorable à la pullulation de la péripneumonie est entre $+ 36^{\circ}$ et $+ 38^{\circ}$. A cette température, l'opalescence apparaît dans le bouillon sérum après le deuxième jour; puis le trouble augmente jusque vers le dixième jour, mais il n'est plus en rapport avec la multiplication du microbe, car ce louche est dû en grande partie à des précipités albumineux.

En effet, si l'on fait chaque jour un ensemencement sur gélose sérum, on remarque que la culture atteint son maximum entre le cinquième et le huitième jour; puis elle diminue graduellement jusqu'au vingtième jour.

Après un mois de séjour à l'étuve, la culture est difficilement régénérée.

Dans les tubes de bouillon sérum témoins, ce trouble apparaît quelquefois lorsque la température dépasse 38° . Cette opalescence n'est pas due à une culture microbienne, mais à une précipitation de phosphates et d'albuminoïdes produite par la température élevée de l'étuve.

Il va sans dire que ces tubes troublés ensemencés sur milieux solides ne donnent aucune culture.

Les limites extrêmes de température où peut se faire le développement de ce microbe sont $+ 42^{\circ}$ et $+ 30^{\circ}$.

Le virus péripneumonique, soit dans la sérosité, soit en culture en bouillon sérum, est détruit à $+58^{\circ}$. Ce microbe ne forme donc pas de spores.

Placées à la température de 10° à 15° en ampoules scellées, les cultures peuvent se conserver dix mois et plus, alors qu'à la température de l'étuve elles sont difficilement réensemencables au bout d'un mois.

Après plus d'une année, la sérosité prélevée d'un poumon hépatisé congelé est aussi virulente que le premier jour. M. Laquerrière (1) a employé ce procédé pour conserver la sérosité utilisée pour les inoculations vétérinaires.

L'étude de l'action des antiseptiques sur les cultures *in vitro* serait facile à étudier si les inoculations pouvaient être faites sur de petits animaux. Mais les bovins étant seuls sensibles, le matériel expérimental est coûteux et rend les recherches plus rares. On sait cependant que l'acide phénique en solution étendue (2 p. 1000) n'atténue pas sa virulence et est employé pour la conservation de la sérosité d'après la méthode de M. Nocard.

Importance du sérum dans les milieux de cultures. — Le microbe de la péripneumonie ne cultive que dans les milieux contenant du sérum. C'est là une règle absolue dans la culture de ce microorganisme. La quantité de sérum peut être minime, mais elle est nécessaire.

Lorsque, dans un tube de bouillon peptonisé préparé

(1) LAQUERRIÈRE. Sur la conservation du virus péripneumonique par la congélation. *Bull. de la Société vétérinaire*, 1890.

selon la méthode de M. L. Martin, on ensemence plusieurs gouttes de sérosité péripneumonique, on obtient toujours une culture trois jours après. La quantité de sérosité apportée avec la semence a suffi à la pullulation du microbe. En effet, si l'on ensemence une trace de cette culture dans un nouveau tube de bouillon peptonisé sans sérum, on ne constate aucune opalescence dans le milieu. La culture ne se fera que si l'on a ajouté une certaine quantité de sérum et, grâce à la présence de ce dernier, les repiquages peuvent se faire indéfiniment.

Au-dessous de la proportion de 5 % de sérum, la culture se fait avec un retard et l'opalescence est discrète.

Plus on augmente la proportion de sérum et plus luxuriante est la culture ; mais, en dépassant la dose de 10 % de sérum, on obtient des bouillons très opalescents dans lesquels il est impossible de suivre la culture du microbe. Aussi, pratiquement, on ne doit pas dépasser cette proportion de sérum dans les milieux liquides.

Le mélange de bouillon et de sérum est nécessaire pour cultiver la péripneumonie. La culture ne se fait jamais sur sérum seul liquide ou gélatinisé à 70°.

Toutes les albumines ne sont pas propices à la culture de ce microbe ; dans les bouillons additionnés d'albumine d'œuf, nous n'avons pu obtenir l'opalescence caractéristique de la culture péripneumonique.

L'albumine végétale que l'on retire de l'eau ayant servi à l'extraction du gluten nous a donné des résultats négatifs.

Seule la sérine semble être indispensable au développement de la péripneumonie dans les milieux artificiels.

Le sérum provenant d'espèces animales réfractaires à la péripneumonie a-t-il une influence sur la culture de ce microbe ?

Nous avons étudié le sérum humain, le liquide d'ascite, le sérum de cheval, de porc, de mouton, de chèvre, de lapin, de cobaye et de poule, et nous avons toujours obtenu des cultures dans les bouillons contenant ces différents sérums.

Cependant, nous avons remarqué que les cultures se faisaient plus rapidement et étaient plus riches dans les milieux contenant du sérum de lapin ; au contraire, dans les bouillons additionnés de sérum de cobaye, la culture était plus discrète.

D'ailleurs MM. Nocard et Roux avaient constaté l'opalescence des cultures dans les sacs de collodion ou de roseau retirés de la cavité péritonéale du lapin, alors que le contenu des sacs laissés six semaines dans le péritoine du cobaye contenait un liquide aussi limpide qu'au moment de l'ensemencement.

Pour nos passages successifs en milieux artificiels, nous employons de préférence le bouillon additionné du sérum normal de bœuf afin de conserver au microbe de la péripneumonie sa virulence primitive.

Après un certain nombre de passages en sacs de collodion dans l'organisme du lapin, le microbe s'atténue et ne tue que rarement l'animal inoculé en région défendue. Au contraire, les cultures *in vitro* en bouillon sérum de bœuf, même après une longue série de repiquages, sont encore aussi virulentes que la sérosité naturelle.

Le sérum des animaux ayant eu la péripneumonie a-t-il une action sur les cultures de ce microbe ?

Une vache actuellement en cours d'immunisation à l'École d'Alfort donne un sérum thérapeutique dont nous avons étudié les propriétés au point de vue agglutinant et bactéricide. Le sérum de cet animal hypervacciné, ajouté à une culture jeune de péripneumonie, ne provoque

aucune agglutination soit à la température de la chambre, soit à la température de l'étuve. Le bouillon conserve son opalescence.

Le microbe de la péripneumonie cultive aussi bien dans le bouillon additionné de sérum antipéripneumonique que dans les milieux contenant du sérum normal. Quelques gouttes de cultures laissées en contact, en ampoules scellées, avec du sérum antipéripneumonique pendant 24 et 48 heures et réensemencées en bouillon sérum donnent des cultures fécondes. Le sérum des animaux hypervaccinés n'est donc pas bactéricide et l'agglutination ne peut être d'aucun secours dans le diagnostic de la péripneumonie.

Influence des peptones. — Si l'on veut étudier l'influence des différentes peptones sur la culture de la péripneumonie, il est de toute nécessité de n'employer que des mélanges d'eau peptonisée et de sérum. En effet, dans le bouillon de macération de viande non peptonisé, chauffé à 70°, filtré et auquel on a ajouté 8 % de sérum, le microbe péripneumonique donne une légère opalescence après 5 à 6 jours d'étuve.

Aussi obtient-on souvent des cultures discrètes dans les bouillons de viande additionnés de peptones commerciales d'origines diverses, à condition que le chauffage n'ait pas dépassé 70°. Leur stérilisation se fait par filtration sur porcelaine.

Dans les milieux stérilisés à l'autoclave à 115° et additionnés ensuite de sérum, on n'observe que très accidentellement la culture du microbe de la péripneumonie.

Les peptones commerciales ne sont pas de composition constante et donnent des résultats incertains. Aujourd'hui on obtient une culture avec une marque donnée

qui n'en fournit plus si on l'essaye après quelques mois.

C'est pourquoi, pour la culture pratique de la péripneumonie, il faut préparer soi-même sa peptone et cette fabrication se fait aujourd'hui couramment dans les laboratoires.

Si on se trouve dans l'impossibilité de se procurer des pansees de porc pour la préparation de l'eau peptonisée d'après la méthode de M. L. Martin, on peut avoir recours à la pepsine commerciale et faire ainsi une digestion artificielle.

Nous employons dans ce cas les proportions suivantes :

Viande de veau hachée.....	200 gr.
Pepsine en paillettes.....	5 —
Acide chlorhydrique.....	10 —
Eau à 50°..	1000 —

La digestion et la préparation du bouillon peptonisé (1) se font exactement comme avec le bouillon de panse.

Ces peptones préparées au laboratoire peuvent supporter une température de + 120°, sans qu'elles aient perdu notablement leur qualité nutritive pour le microbe de la péripneumonie, alors que la plupart des échantillons de peptones du commerce sont devenus impropres à la culture de la péripneumonie après un chauffage à 115°.

C'est parce qu'elles supportent bien la chaleur qu'on peut employer ces peptones de laboratoire pour la préparation des milieux gélosés.

(1) Le lait diastasé additionné de sérum convient aussi à la culture de la péripneumonie.

Nous le préparons de la façon suivante :

Lait stérilisé à 105°.....	1000 gr.
Solution de pancréatine à 2 %.....	
stérilisée par filtration.....	400 gr.

Le mélange doit être fait aseptiquement : Mettre à l'étuve à 40° pendant 48 heures. Chauffer à 80° pour détruire la diastase, alcaliniser et filtrer.

Nous avons aussi essayé une albumose soluble, non précipitable par la chaleur et connue dans le commerce sous le nom de *somatose*. Jamais nous n'avons obtenu de culture dans ce milieu additionné de sérum.

Dans les essais de culture sur milieux solides, on doit autant que possible se servir de la sérosité pulmonaire pour l'ensemencement.

Si on puisait la semence dans une culture en bouillon, on transporterait sur le milieu à essayer, en même temps que le microbe, un peu de substance nutritive suffisante à un commencement de développement; mais un second repiquage sur milieu solide ne donnera lieu à aucune croissance.

Modifications chimiques des milieux cultivés. — La présence de ce microorganisme, dont la culture n'est décelée que par une légère opalescence du bouillon où il s'est multiplié, ne peut être contrôlée que par son action pathogène, c'est-à-dire par l'inoculation aux bovidés.

Il est permis de penser qu'il peut exister des microbes saprophytes aussi petits et même d'une ténuité telle qu'ils cultivent dans les milieux artificiels sans en changer l'apparence. Dans ce cas, les modifications chimiques du milieu pourraient seules prouver l'existence d'une culture microbienne.

Nous avons donc étudié le microbe pathogène au point de vue de son action chimique.

Dans le bouillon sérum où s'est développé le microbe de la péripneumonie, on ne note, comme réaction, qu'une légère diminution dans l'alcalinité du milieu. Si l'on ajoute au bouillon nutritif différents sucres dans la proportion de 5 %, nous constatons que les milieux addi-

tionnés de glucose, de levulose ou de maltose deviennent neutres, puis franchement acides.

L'acidité évaluée en acide sulfurique peut atteindre 1 %. Cette formation d'acide n'est pas accompagnée de dégagement gazeux visible, même si l'on a eu soin d'ajouter du carbonate de chaux.

Les acides qui prennent naissance aux dépens du sucre complètement transformé sont des acides volatils dont la courbe, formée d'après le procédé d'analyse de M. Duclaux, tend à se confondre avec celle de l'acide acétique.

Au contraire, les bouillons contenant du saccharose, du lactose ou du galactose restent alcalins. Il en est de même des mieux glycinés.

L'empois d'amidon n'est pas saccharifié par le microbe de la péripneumonie.

A ce propos, nous ajouterons que, dans ces recherches sur l'amidon, le sérum qui entre dans la composition du bouillon nutritif doit avoir été au préalable chauffé à $+ 58^{\circ}$ pour détruire l'amylase qu'il contient.

Cette diastase, reconnue par Claude Bernard et Magendie, saccharifie à la température de l'étuve la matière féculente et peut ainsi fausser les données de l'expérience.

Les modifications chimiques des milieux où se cultive le microbe péripneumonique sont donc suffisantes pour déceler la culture d'un microorganisme aussi ténu sans recourir à son action pathogène.

CHAPITRE IV

Isolement du microbe de la péripneumonie par filtration.

Dans son mémoire de la fièvre aphteuse, Löffler (1) démontrait qu'il existe des microbes d'une ténuité telle qu'ils traversaient les bougies filtrantes.

Löffler prélève le contenu d'une pustule aphteuse qu'il mélange à de l'eau dans la proportion de 1/50 ; puis il filtre cette dilution sur terre d'infusoires ou porcelaine. Le filtrat injecté à des animaux provoque chez eux une éruption aphteuse caractéristique.

M. Nocard reprit à l'école d'Alfort ces expériences, et ses résultats concordent absolument avec ceux de l'expérimentateur allemand.

Au cours des recherches sur la péripneumonie, maintes fois les bactériologistes avaient filtré la sérosité péripneumonique sur plâtre ou sur porcelaine. L'injection de la sérosité filtrée ne provoquait aucun symptôme morbide ni immunité chez les animaux inoculés.

On se basait sur ce fait pour prouver que l'agent pathogène de la péripneumonie n'était pas un poison soluble, mais bien un être vivant.

Lorsqu'on parvint à cultiver le microbe de la péripneumonie, nous avons filtré fréquemment les cultures pour savoir s'il existait une toxine soluble. Or les

(1) LÖFFLER. Sur la fièvre aphteuse. *Recueil de Méd. vétérinaire*, 1898.

cultures filtrées, comme la sérosité, ne donnait aucune culture lorsqu'on plaçait le filtrat à l'étuve. Le microbe ne traverse donc pas les filtres dans son milieu de culture (bouillon sérum à 8 %).

Ce n'est qu'après le travail de Löffler sur la fièvre aphteuse et en employant sa méthode de dilution que nous réussîmes à faire traverser les bougies filtrantes à l'agent spécifique de la péripneumonie.

La question de dilution et de la qualité des parois filtrantes est capitale si l'on veut obtenir des résultats positifs.

Lorsqu'on filtre un liquide albumineux, la première partie de l'opération se fait bien, puis la filtration se ralentit et s'arrête : l'albumine colmate la bougie et le liquide recueilli ne traverse plus la paroi filtrante que par dialyse.

Voilà pourquoi nous n'avions obtenu que des succès en filtrant les cultures en bouillon sérum à 8 %.

En effet, pour que le microbe de la péripneumonie traverse les filtres, il ne faut pas que la quantité de la sérosité présente dans le liquide dépasse 2 % ; au delà de cette proportion, les résultats sont inconstants.

D'autre part, les bougies employées sont plus ou moins poreuses et ne conviennent pas toutes à la filtration de la péripneumonie. Les unes, en terre d'infusoires comme le filtre Berkefeld, sont d'une grande porosité ; les autres sont faites en porcelaine dégourdie, à pâte plus ou moins serrée comme les marques F et B des bougies Chamberland.

La bougie Berkefeld filtre rapidement les liquides albumineux et est traversée avec facilité par le microbe de la péripneumonie. Mais le filtrat obtenu avec ce filtre contient souvent en suspension de fines particules terreuses

qui troublent le liquide et gênent par suite l'observation de la culture qui s'y est développée.

Aussi utilisons-nous de préférence pour les filtrations la bougie Chamberland qui donne un bouillon parfaitement limpide permettant de noter de bonne heure l'opalescence de la culture.

Ces filtres portent une initiale au niveau de l'embase et à l'extrémité de la bougie. La bougie F est faite d'une pâte de porcelaine assez poreuse permettant une filtration rapide. Le microbe de la péripneumonie traverse sans difficulté cette porcelaine.

La bougie B, au contraire, filtre lentement les liquides et est une barrière infranchissable pour ce microorganisme invisible, quelque faible que soit la dilution employée.

Le passage du microbe de la péripneumonie à travers les parois filtrantes offre un grand intérêt au point de vue de la technique bactériologique.

Jusqu'à présent les filtres étaient considérés comme un procédé parfait pour stériliser les milieux liquides altérables par la chaleur.

Aujourd'hui, ils peuvent devenir, dans l'étude des infiniment petits, de précieux auxiliaires pour l'isolement de ces microorganismes à la limite ou au delà de la limite de la visibilité humaine, en retenant sur leur paroi filtrante les microbes d'une certaine dimension.

Lorsqu'il est possible de recueillir dans des conditions de pureté absolue la sérosité péripneumonique, il vaut mieux ensemer immédiatement le bouillon sérum.

Si l'on craint la présence de quelques germes étrangers dans la semence, rien ne serait plus facile de faire un isolement sur gélose sérum. Mais nous savons que sur milieu solide les colonies de péripneumonie poussent lentement et ne sont visibles qu'après trois jours d'étuve ; pendant

ce laps de temps, les microbes à pullulation rapide, comme le pneumobacillus d'Arloing que l'on rencontre fréquemment dans le poumon des bovidés (1), envahissent la surface de la gélose et rendent impossible tout repiquage.

En employant la méthode de la filtration, on n'éprouvera aucun de ces inconvénients : la sérosité peut être recueillie sans précaution aucune, soit sur un bloc pulmonaire envoyé au laboratoire, soit puisée d'après la méthode des fontaines utilisée dans la pratique vétérinaire. Peu importe même que la sérosité ait subi un début de putréfaction ; dans ce cas même, il est possible d'isoler par filtration le microbe de la péripneumonie.

Voici d'ailleurs la technique que nous suivons pour arriver à ce résultat :

La sérosité pulmonaire est diluée dans la proportion de 1 à 2 parties pour 100 parties de bouillon préparé selon la méthode Martin, chauffé à 70° et *non additionné de sérum*.

Ce bouillon aura été précédemment filtré sur bougie Chamberland. Cette filtration n'a pas pour but de stériliser le milieu ; elle ne sert qu'à purifier le liquide de toutes les particules solides qui s'y trouvent en suspension et pourraient entraver la filtration d'isolement.

Le mélange de sérosité et de bouillon est alors filtré sur bougie Berkefeld ou sur bougie Chamberland F.

Le liquide que l'on a recueilli après cette filtration ne contient qu'une quantité de sérum insuffisante pour la multiplication du microbe de la péripneumonie. Il n'y aura donc qu'à ajouter au filtrat assez de sérum pour que le bouillon devienne favorable à la culture du microbe, c'est-à-dire 8 parties de sérum normal pour 100 parties de bouillon.

(1) LIGNIÈRES. Le *Pneumobacillus liquefaciens bovis*, hôte normal du poumon sain. (*Bull. de la Société de Médecine vétérinaire*, 1896.)

Pour éviter les contaminations possibles, nous préférons, à la fin de la filtration, faire passer sur la bougie qui sert à l'isolement la quantité de sérum nécessaire.

Le liquide, filtré et additionné de sérum comme nous venons de le dire, est mis à l'étuve. Trois à quatre jours après, le bouillon devient opalescent et cette opalescence est l'indice de la culture du microbe de la péripneumonie.

En effet, cette opalescence se transmet par ensemencement sur bouillon sérum alors que le bouillon simple reste limpide.

Une goutte de ce bouillon opalin étalée sur gélose sérum donne naissance à de très fines colonies d'abord transparentes, puis mamelonnées, identiques à celles que nous avons décrites au chapitre précédent. Enfin l'inoculation reproduira l'infiltration de la péripneumonie.

Dans la technique de l'isolement par la filtration, la répartition du bouillon filtré peut être la cause de contamination du milieu. Aussi recommandons-nous de simplifier autant que possible ces manipulations.

L'appareil qui nous a rendu les plus grands services est le filtre qu'emploie le docteur Martin pour faire les essais de toxines et dont nous donnerons la description succincte :

« Cet appareil se compose essentiellement d'un tube à
« essai enveloppant une bougie Chamberland; tube et
« bougie sont placés dans une chambre à vide, tandis que
« l'intérieur de la bougie est en communication avec le
« liquide à filtrer (fig. 1).

« La partie filtrante de l'appareil est constituée par une
« bougie-Chamberland sans embase dite bougie de labora-
« toire; cette bougie est vernissée à l'intérieur et à l'exté-
« rieur sur une longueur de 5 centimètres à partir de son
« orifice. Autour de la partie vernissée on enroule du

« coton ordinaire et on adapte la bougie à l'extrémité d'un
« tube à essai de façon qu'elle pénètre à frottement
« dur.

« Lorsqu'on veut filtrer, on prend un de ces appareils

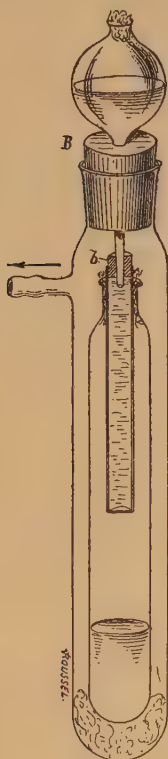


Fig. 1.



Fig. 2.

« stérilisé d'avance, on enlève le coton qui ferme l'ori-
« fice de la bougie et on met l'intérieur en communi-
« cation avec un réservoir qui contient le liquide à filtrer.

« Ce réservoir est formé par une boule de verre ouverte
« à l'un de ses pôles et soudée par le pôle opposé à un
« tube de verre qui s'engage dans l'orifice de la bougie ;

« un bouchon de caoutchouc perforé (b) sert à fixer le tube
« du réservoir à cet orifice.

« Lorsqu'on a réuni la bougie à son réservoir, on place
« tout l'appareil dans un tube de verre; ce tube-manchon
« est fermé à l'une de ses extrémités, ouvert à l'autre;
« mais cette ouverture doit être obturée par un bouchon
« de caoutchouc perforé en son centre B.

« Quand la filtration est terminée, on enlève la bougie
« de l'intérieur du tube à essai, elle est aussitôt remplacée
« par le tampon de coton d'un gros tube flambé (1). » (Fig. 2.)

On peut ainsi filtrer de petites quantités (60 cc.) de la
dilution péripneumonique à 2 % et mettre à l'étuve, sans
transvasement, ces tubes contenant tout le liquide filtré et
additionné du sérum nécessaire à la culture de la péri-
pneumonie.

(1) MARTIN. Production de la toxine diphtérique. *Ann. de l'Institut Pasteur, loc. cit.*

CHAPITRE V

Expérimentation.

Les animaux de l'espèce bovine sont seuls sensibles au virus péripneumonique.

Ce fait avait été reconnu par Willems : l'inoculation de sérosité pulmonaire faite à des animaux autres que des bovidés, tels que lapin, dindon, poule, chien, chèvre, mouton, porc, ne lui avait donné que des résultats négatifs.

Ces expériences ont été reprises maintes fois et n'ont jamais abouti qu'à des succès.

Nous avons injecté aux petits animaux de laboratoire (lapin, cobaye, souris) des quantités considérables de culture de péripneumonie, dont quelques gouttes suffisent à déterminer chez les bovins une maladie mortelle, et jamais nous n'avons pu provoquer de symptôme morbide, quel qu'ait été le mode d'inoculation (injection intrapéritonéale, intraveineuse ou intracrânienne).

Toute la partie expérimentale avec les cultures de péripneumonie a été faite sur les bovidés par M. Nocard et nous résumerons ici les résultats obtenus par lui à l'École vétérinaire d'Alfort (1).

L'inoculation sous-cutanée en région défendue (fanon ou épaule) de quelques gouttes de culture en bouillon détermine un engorgement comparable à celui que l'on

(1) ROUX, NOCARD et DUJARDIN-BEAUMETZ, *Recueil de Médecine vétérinaire*, 1899.

observe après inoculation de sérosité pulmonaire. (Observation I.)

Après une période d'incubation de six à vingt jours, apparaît au point d'inoculation une tumeur chaude, dure et sensible. Cette tuméfaction, d'abord de la dimension de la main, devient bientôt aussi volumineuse qu'un pain de munition. L'animal succombe le plus souvent à cet engorgement qui a progressé dans tous les sens et a envahi toute la paroi abdominale.

Les tentatives de production de la maladie naturelle ont jusqu'ici complètement échoué.

La pulvérisation de culture de péripneumonie faite devant les naseaux de l'animal n'ont déterminé ni symptôme morbide ni immunité.

L'injection intrapulmonaire de 15 gouttes de culture n'a provoqué chez le seul animal sur lequel on ait expérimenté aucune réaction, mais cependant lui a conféré l'immunité. D'ailleurs cette unique expérience ne permet pas de conclure à l'innocuité de ce procédé.

L'injection intrapéritonéale a été suivie d'une péritonite exsudative (5 à 6 litres de sérosité) avec adhérences fibrineuses peu résistantes.

L'inoculation dans la chambre antérieure de l'œil n'a déterminé aucun symptôme local ni aucune réaction chez deux génisses inoculées de cette façon avec 5 gouttes de culture virulente.

Ces deux animaux injectés en arrière de l'épaule trois mois après avec de la sérosité pulmonaire sont demeurés réfractaires à cette inoculation sévère.

Quelques gouttes de culture injectées dans le cerveau provoquent chez l'animal une maladie spéciale : on constate chez lui de la torpeur, de la somnolence suivie d'accidents vertigineux. L'hyperesthésie est extrême et le

moindre souffle détermine chez le bovin des accès de vertiges assez comparables à ceux que l'on voit survenir quelquefois chez les herbivores enragés.

Ces phénomènes nerveux s'observent à la suite d'injections cérébrales, surtout chez les animaux adultes ou sevrés : au contraire, chez les veaux encore à la mamelle, on voit survenir des arthrites multiples, comme on l'observe si souvent après l'inoculation sous-cutanée. (Observation II.)

L'inoculation de culture péripneumonique à la queue détermine un engorgement limité, en tous points semblable à celui que l'on observe à la suite d'inoculation de sérosité naturelle. Comme elle, elle confère l'immunité et peut donc remplacer les inoculations willemsiennes.

Déjà de nombreux vétérinaires ont eu recours à la culture en bouillon et ont obtenu des résultats des plus satisfaisants.

L'injection se fait au toupillon à la dose de $1/4$ à $1/2$ centimètre cube.

675 bovins ont été vaccinés suivant ce procédé :

67 par MM. Laquerrière, Moulé, Robcis et Nocard ;

154 par M. Jouanne (de Soissons) ;

232 par MM. Duluc père et fils (de Bordeaux) ;

222 par M. Toulouze (d'Ambarès).

Dans ce dernier lot, 14 animaux sont morts des suites de l'inoculation. Il faut dire que ces troupeaux étaient dans un état d'entretien déplorable. Mis en pâture dans une région sans abri, au mois d'août dernier, n'ayant pour nourriture qu'une herbe desséchée, et privés de tous soins par la négligence de leurs propriétaires, ces animaux n'ont pu être surveillés.

Tous les autres bovidés (453) ont été inoculés à l'étable et l'on n'a constaté aucun décès. Les accidents se sont réduits à quelques chutes de queues.

« Il est donc permis de dire qu'appliquées dans les conditions ordinaires de la pratique sur des animaux surveillés et traités dès qu'il y a menace d'accidents, les injections de culture à la queue donnent des résultats très supérieurs à ceux de la sérosité naturelle (1). »

OBSERVATION I

INOCULATION SOUS-CUTANÉE DE CULTURE PÉRIPNEUMONIQUE ISOLÉE
PAR FILTRATION.

Vache normande, 8 ans

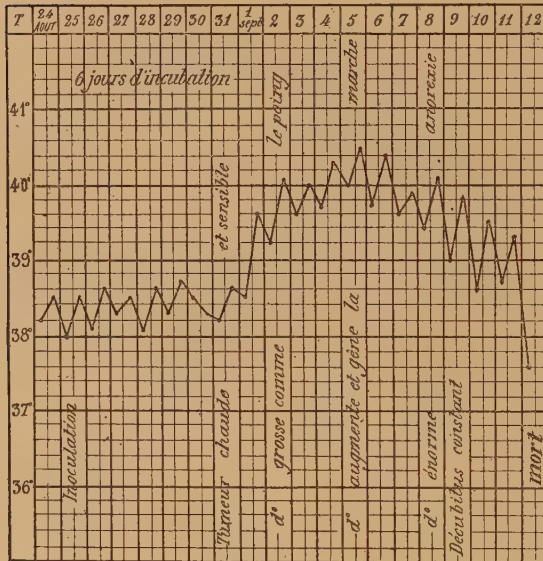


Fig. 3.

Le 25 août 1899, M. Nocard injecte sous la peau, en arrière de l'épaule droite, 1 centimètre cube de culture peripneumonique (qua-

(1) ROUX, NOCARD et DUJARDIN-BEAUMETZ, *Recueil vétérinaire*, 1899, loc. cit.

trième repiquage d'une culture de péripneumonie isolée par filtration sur porcelaine).

Le 31 août, on note un peu d'engorgement chaud et douloureux au point d'inoculation.

Le 1^{er} septembre, la tuméfaction a les dimensions de la paume de la main; l'animal se défend du pied quand on l'explore. Le soir, température 39°6.

Le 2, même état. Tumeur plus tendue et plus douloureuse. Température : 40°1.

Le 5, l'engorgement a les dimensions et la forme d'un pain de munition, le jeu du membre est très gêné. Température : 40°5.

Le 8, l'engorgement est énorme; il envahit le tissu cellulaire du fanon, de l'épaule et du bras, écarte le membre et s'étend sous le ventre jusqu'aux mamelles. La vache est triste; elle mange à peine, la respiration est très accélérée, 42 par minute; le pouls est mou et vite (80 par minute). Température : 40°1.

Le 9, l'animal est en décubitus sternal, incapable de se relever. La respiration est très vite, irrégulière, tremblotante et s'accompagne d'une plainte.

La mort survient le 12.

A l'autopsie, les organes de la cavité thoracique sont complètement sains; la seule lésion observée consiste en une infiltration séreuse extrêmement considérable du tissu cellulaire sous-cutané du thorax, de l'abdomen, du fanon, de l'épaule et du bras; à chaque coup de couteau jaillit un flot de sérosité jaune et limpide: l'infiltration n'existe pas seulement dans le tissu conjonctif intermusculaire, mais jusque dans le tissu interfasciculaire; les muscles les plus denses présentent, sur une coupe transversale, l'apparence d'une sclérose intense où le tissu fibreux interstitiel est remplacé par l'infiltration séreuse; en pressant dans la main un fragment du muscle, on en exprime comme d'une éponge imbibée d'eau une grande quantité de sérosité jaune et limpide.

OBSERVATION II

INOCULATION INTRA-CÉRÉBRALE DE CULTURE PÉRIPNEUMONIQUE
ISOLÉE PAR FILTRATION.

Veau de lait âgé de 4 mois.

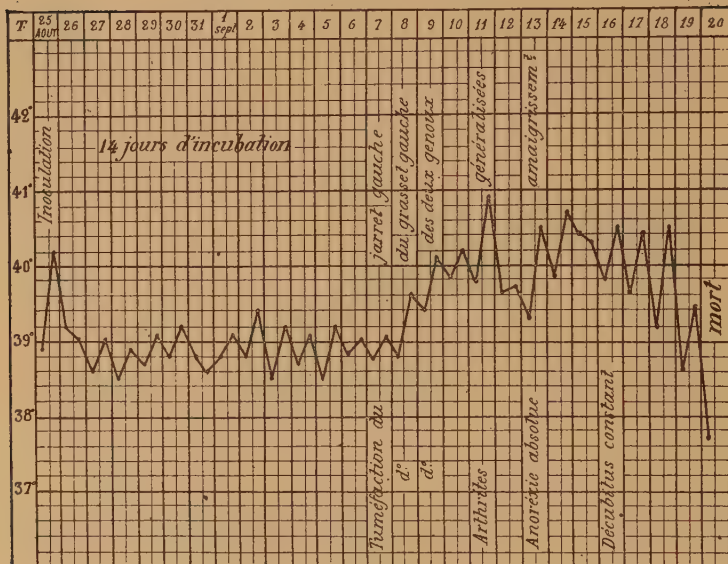


Fig. 4.

Le 25 août 1899, M. Nocard injecte dans le lobe cérébral gauche de ce veau 10 gouttes d'une quatrième culture de péripneumonie ayant pour origine de la sérosité pulmonaire filtrée sur porcelaine.

L'animal, remis en box, ne paraît pas se ressentir de l'opération, il mange avec appétit et rien dans son attitude ne dénote une souffrance quelconque. Pourtant, le soir, sa température est de 40°2, en élévation de plus d'un degré sur celle du matin.

Le lendemain, la température est redevenue normale et jusqu'au 7 septembre elle se maintient autour de 39°. Pendant tout ce temps le veau continue à têter et à manger comme précédemment; on n'observe aucun trouble de la locomotion, de la respiration ou de la circulation.

Le 7 septembre, l'animal paraît un peu triste; il boite du membre postérieur gauche; le jarret est très sensible à la pression, il est chaud, tendu, un peu engorgé; la température est encore normale.

Le 8, la température est à 39°7; l'articulation du grasset est prise à son tour; elle est extrêmement sensible à l'exploration de la main; le membre ne sert plus à l'appui, il repose sur le sol, par l'extrémité des onglons; les battements du cœur sont précipités, la respiration est courte, tremblotante, très vite; on compte 42 respirations et 136 pulsations.

Le 9, 40°2; le jarret et le grasset sont énormément tuméfiés, tendus, extrêmement douloureux. Les deux genoux commencent à se prendre. Appétit presque nul.

Le 11, l'animal est trouvé couché sur la litière, incapable de se tenir debout. Les articulations du boulet, du genou et du coude, du jarret et du grasset sont le siège d'une inflammation aiguë, intense,

Température : 40°9.

A partir de ce moment, l'animal cesse complètement de manger. Il reste étendu sur la litière, en decubitus latéral complet, l'encolure renversée en arrière, la tête étendue comme dans le tétanos.

De loin en loin, on note de véritables accès convulsifs pendant lesquels la tête et l'encolure sont comme contracturées en arrière, avec pirouettement des yeux, raideur des membres en extrême extension; puis tout se calme et l'animal semble plongé dans le coma.

La mort survient le 20 septembre, l'animal est réduit à l'état squelettique.

Autopsie. — Intégrité complète des organes de la cavité thoracique. Exsudat fibrineux très dense et très abondant dans toutes les synoviales articulaires et tendineuses de l'organisme; on en retrouve jusque dans l'articulation atloïdo-occipitale et même entre les surfaces articulaires des apophyses transverses des vertèbres cervicales.

A l'ouverture du crâne, on observe des lésions intenses de pachyméningite tout autour du trajet de l'aiguille inoculatrice; épaississement et infiltration œdémateuse des méninges du côté gauche; exsudat gélatiniforme de la cavité de l'arachnoïde; liquide céphalo-rachidien très abondant, opalin, blanchâtre; infiltration séreuse, intense de tout le lobe cérébral gauche dont le tissu mou et diffus est aspiré très aisément dans des pipettes stérilisées.

Le lobe droit, la protubérance, le bulbe et la moelle ont conservé leur apparence et leur consistance normales.

CONCLUSIONS

L'agent spécifique de la péripneumonie contagieuse des bovidés est le premier microorganisme à la limite de la visibilité que l'on ait réussi à cultiver *in vitro*.

Ce microbe ne se multiplie que dans des conditions étroites de culture; il ne se cultive pas en effet dans les milieux utilisés d'ordinaire dans les laboratoires et ne donne des cultures fécondes que dans un bouillon sérum spécial.

Ce milieu est un mélange d'eau peptonisée préparée avec des estomacs de porc (méthode du D^r L. Martin) et de macération de viande auquel on ajoute du sérum normal dans la proportion de 6 à 8 %.

Les peptones commerciales ne donnent dans la culture de ce microbe que des résultats variables.

Le sérum est indispensable à la pullulation de la péripneumonie. La quantité peut être minime, mais elle est nécessaire.

La culture en bouillon sérum est caractérisée par une opalescence discrète que l'on ne peut distinguer au début que par comparaison avec un tube témoin.

Sur milieu solide, la péripneumonie forme de fines colonies visibles à la loupe et atteignant même 1 millimètre de diamètre.

Ce microbe est d'une ténuité extrême et les plus forts grossissements du microscope ne permettent de décèler que des points mobiles et presque invisibles.

Sur les préparations colorées, on ne constate qu'une

fine poussière dont il est impossible de distinguer les éléments.

Il se colore cependant sans difficulté. Les colonies prises en bloc prennent les couleurs basiques d'aniline et les réactifs colorants nucléaires.

Il se décolore par la méthode de Gram.

Les modifications chimiques produites par le développement de ce microbe pathogène dans les bouillons sucrés nous permettent de penser qu'il peut exister des microbes saprophytes d'une telle ténuité qu'ils ne changeraient pas l'apparence des milieux de culture et dont la présence ne pourrait être prouvée que par l'analyse chimique.

De même que l'agent spécifique de la fièvre aphteuse, le microbe de la péripneumonie traverse les filtres de porcelaine (Chamberland, marque F) et de terre d'infusoires (Berkefeld). Ce passage à travers les parois filtrantes ne se fait que si la proportion de sérosité ne dépasse pas 2 %.

Le filtre peut donc devenir, dans l'étude des infiniment petits, un appareil parfait d'isolement.

Enfin, au point de vue de la pratique vétérinaire, les cultures *in vitro* de la péripneumonie peuvent remplacer avantageusement la sérosité pulmonaire dans les inoculations préventives faites d'après le procédé de Willems.

Vu :
Le Doyen,
BROUARDEL.

Vu :
Le Président de Thèse,
A. CHANTEMESSE.

Vu et permis d'imprimer :
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
GRÉARD.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

I. — Colonies de péripneumonie sur gélose sérum. Grossissement 20.

II. — Colonies confluentes. Même grossissement.

III. — Colonies sur gélose sérum colorées à l'hématoxyline. Grossissement 50.

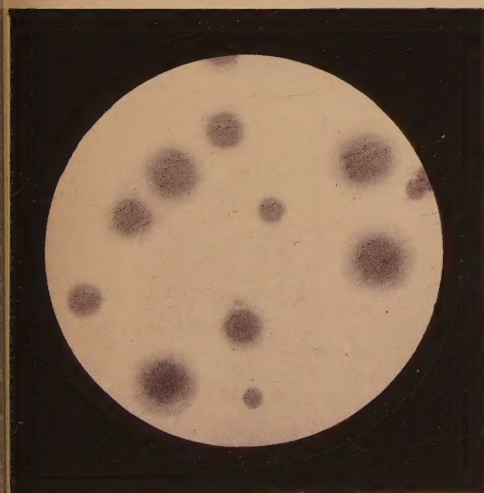
IV. — Coupe de la gélose sérum montrant l'incrustation des colonies. Coloration à l'hématoxyline. Même grossissement.



I



II



III



IV

PARIS — IMPRIMERIE F. LEVÉ, RUE CASSETTE, 17.
